

TGF- β /BMPs、Wnt 和 MAPK 信号通路在 间充质干细胞向成骨细胞分化中的作用

万晓晨 刘翠平 陈海啸¹ 李继承*

(浙江大学细胞生物学研究所, 杭州 310058; ¹浙江省台州医院, 临海 317000)

摘要 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种多潜能成体干细胞, 具有向成骨细胞分化的能力。在MSCs向成骨细胞分化中, 受到多种信号通路调控, 其中TGF- β /BMPs、Wnt、MAPK信号通路发挥了重要作用。而且, 通过对Smad1蛋白酶体的调节, Wnt和MAPK信号可以对TGF- β /BMPs通路进行调控。在相关信号通路的共同作用下, MSCs向成骨细胞分化。现对MSCs分化过程中TGF- β /BMPs、Wnt、MAPK这三条通路进行了简要综述。

关键词 间充质干细胞; 成骨细胞分化; TGF- β /BMPs信号通路; Wnt信号通路; MAPK信号通路

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种多潜能成体干细胞, 主要存在于骨髓。体外分离培养后, 在一定的诱导条件下, MSCs具有向成骨细胞、软骨细胞、神经细胞、脂肪细胞和心肌细胞等多向分化的能力^[1]。MSCs向成骨细胞分化受到多方面因素的影响, 如激素、细胞因子等。研究表明, 多种信号通路调控MSCs向成骨细胞分化。本文主要阐明在MSCs向成骨细胞分化中, 转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)/骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)信号通路、Wnt信号通路和促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路的功能, 以及激活的Wnt信号通路和MAPK信号通路, 对TGF- β /BMPs通路进行的调节作用。

1 TGF- β /BMPs信号转导途径与成骨细胞分化

TGF- β 蛋白超家族包括TGF- β s、细胞活素和BMPs等^[2], 是与结构相关的二聚体生长因子家族, 其受体均为丝氨酸/苏氨酸激酶受体, 其中Smads (mothers against decapentaplegic)信号蛋白是其下游重要的信号分子, 在细胞增殖、分化和细胞基质形成方面有广泛而重要的生物学功能^[3]。

Sekelsky等^[4]和Savage等^[5]发现, 在果蝇及秀丽隐杆线虫中, 分别存在着同源基因Mad和Sma, 它们编码的蛋白质是丝氨酸/苏氨酸激酶受体下游的转录

调节物, 在信号转导中发挥着重要的作用, 于是将脊椎动物中与Mad和Sma同源的基因统称为Smad。

在细胞中, Smads是TGF- β /BMP细胞内信号转导最重要的下游信号转导介质, 其家族一共发现有8个成员, Smad1~Smad8。Smad1、Smad2、Smad3、Smad5、Smad8同Smad4一起转移入核, 活化基因转录^[6]。Smads进入核后有3种调节转录的方式: ①直接与DNA结合; ②与其他转录因子协同作用; ③与转录活化复合物或抑制物结合^[6]。它们通过不同的调节转录方式, 激活或抑制目的基因表达。TGF- β 和细胞活素特异性的Smad2/3能激活大量目的基因, 比如, 纤溶酶原激活物-1, I型胶原, 细胞周期调控子p15和p21, 转录因子junB等^[7]。

TGF- β 的受体, 包括I型受体和II型受体。在TGF- β 与I型受体结合后, II型受体也结合上去并使I型受体磷酸化, 进而磷酸化与TGF- β 特异作用的Smads信号蛋白, 从而激活细胞内的信号转导^[6]。研究发现, 在人成骨肉瘤细胞MG-63和人间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSC)中, TGF- β 1能引起细胞积聚, 刺激成骨生成, 并能提高碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、I型胶原和骨钙素的活性^[8,9]。然而, 也有研究显示在hMSCs中添加TGF- β 3会显著降低ALP的表达, 表明TGF- β 在

收稿日期: 2008-05-23 接受日期: 2008-09-01

国家基础科学人才培养基金项目(No.J0730856)和浙江省科技厅面上科研社会发展项目(No.2007C33025)资助

*通讯作者。Tel: 0571-88208088, E-mail: lijichen@zju.edu.cn

hMSCs 成骨分化中的作用,有待进一步研究^[10]。

BMPs 的受体有三类: BMPR-IA、BMPR-IB、BMPR-II, 也同样属于丝氨酸/苏氨酸激酶型受体。BMPs 的信号激活途径与 TGF- β 类似, 当 BMP 与 BMPR-IA、BMPR-IB 型受体结合后, BMPR-II 型受体也结合上去, 使 BMPR-IA、BMPR-IB 磷酸化, BMP 受体激酶磷酸化与 BMP 特异作用的 Smads, 继而启动细胞内的信号转导^[11]。

BMPs 是一种生长因子, 可使 Smad1、Smad5、Smad8 磷酸化^[12]。Reddi 等^[13]报道, 除了促成骨生成作用外, BMPs 在脑、眼、毛囊、肾脏、肺、肝脏、皮肤和牙齿等不同器官发育中有不同的作用。比如, BMP2 对心脏的形成有重要作用, BMP7 影响肾脏的形成等。对 BMPs 及其受体的转基因小鼠模型的研究发现, BMP2 和 BMP4 缺失的小鼠心脏和中胚层组织发育异常^[14]。

另外, 在细胞分化方面, 由于种属的差异, 不同 BMPs 也有不同的功能。研究发现, 在 C3H 小鼠骨骼肌细胞 C2C12 中, BMP2、BMP4、BMP6、BMP7 和 BMP9 能诱导 ALP 活性^[15]。在 C2C12 和小鼠胚间充质细胞系 C3H10T1/2 细胞中, BMP2、BMP4、BMP6、BMP7 和 BMP9 能强烈诱导骨钙素表达和细胞矿化^[16]。研究发现, 在 C3H10T1/2 细胞中, BMP2 通过激活锌指转录因子 ZNF450, 诱导成骨分化; 在 C2C12 细胞, BMP2 通过激活成骨细胞特异性转录因子, 如 Runx2/Cbfa1, osterix 和 TAZ (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) 诱导 MSCs 向成骨细胞分化^[17,18]。

已知在不同细胞系的大鼠或小鼠分离的 MSCs 中, BMPs 能诱导 ALP 表达和成骨分化^[19]。但是 BMPs 在 hMSCs 的作用机制比较特殊。在 hMSCs 中, 额外添加 BMP6 能上调成骨细胞相关基因, 如 I 型胶原、骨钙素、骨唾液蛋白、转录因子 Cbfa1/Runx2 和 Osterix 的表达, 表明 hMSCs 确实存在 BMP 受体, 能够对 BMPs 产生应答^[20]。但是, 多数 BMPs 不能诱导 ALP 表达, 也不能对 hMSCs 产生矿化作用。Osyczka 等^[21]研究发现, 当同地塞米松联合作用于细胞时, BMPs 以协同方式上调 ALP 表达, 表明在 hMSCs 中, 地塞米松的作用可能是移除抑制 BMPs 产生 ALP 的分子障碍, 从而促进成骨分化。

2 Wnt/ β -连环蛋白信号转导途径与成骨细胞分化

Wnts 是一类富含 L-半胱氨酸, 约 39~46 kDa 的糖蛋白^[22], 与低密度脂蛋白受体相关蛋白(LDL receptor-related protein, Lrp)/Frizzleds 受体(Fzd)受体复合体结合后, 通过一系列胞质蛋白(Dsh 等)的相互作用, β -连环蛋白在胞质内累积, 入核后与转录因子: T 细胞因子(T cell factor 3, Tcf)/淋巴增强因子-1 (lymphoid enhancer factor 1, Lef-1)作用, 通过与 DNA 序列——YCTTTGWW——结合发挥调节基因转录的作用。这条通路被称为 Wnt/ β -连环蛋白经典途径^[23]。

当存在 Wnt 信号时, 糖原合酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)活性受到抑制, β -连环蛋白在胞内大量累积并进入核内, 从而启动靶基因的表达。在 Wnt 信号不存在时, β -连环蛋白在支架蛋白 axin 的协助下, 与 GSK-3 β 、腺瘤样结肠息肉 (adenomatous polyposis coli, APC)基因表达产物形成复合物, 抑制基因表达^[24], 其中 β -连环蛋白和 APC 在成骨细胞均表达。

稳定表达 Wntl、Wnt3a 可促进 C3H10T1/2 细胞系的增殖, 并诱导 ALP 的活性, 表明 Wnts 能够促进前体成骨细胞的生长, 并促进成骨细胞早期阶段的分化^[25]。此外, Wnt 在成骨细胞定向方面也有作用, Wntl 和 Wnt10b 可抑制脂肪细胞或前脂肪细胞的分化, Wnt3a 在 C3H10T1/2 中过表达能够抑制脂肪细胞标志物 PPAR γ 2 的表达, 促进其向成骨细胞分化^[25]。但是 Gabriel 等^[26]则认为, β -连环蛋白对于间充质干细胞成骨分化的作用, 一方面是通过 Tcf/Lef 的机制, 另一方面是 β -连环蛋白能提高干细胞对成骨因子的应答, 例如 BMP-2, 通过提供诱导信号, β -连环蛋白和成骨因子以协同方式促进干细胞向成骨细胞分化。

3 MAPK信号转导途径与成骨分化

大多数细胞内都存在 MAPKs 信号转导通路, 它是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 能将细胞外信号转导至细胞及其核内, 通过保守的三级级联反应(MAPKKK-MAPKK-MAPK)激活转录因子, 调节基因表达。这一通路与多种细胞功能相关, 可参与细胞运动、凋亡、分化及生长增殖等多种生理过程^[27,28]。目前已确定有 4 条 MAPK 信号转导通路: 细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)信号通路、c-Jun N 端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号通路、p38 信号通路和 ERK5 信号通路^[29]。

Jaiswal 等^[30]研究发现, 在 MAPK 家族成员中, ERK、p38 和 JNK 参与了 hMSCs 成骨分化的信号转

导。ERK 通路在细胞整个发育过程中均可激活,与细胞增殖和起始分化密切相关,而 p38 和 JNK 信号通路很可能是在细胞分化晚期或者凋亡阶段发挥作用。目前对 ERK 通路研究的较为清楚:当细胞外基质与成骨前体细胞接触时,能与细胞表面的整合素受体结合,受体二聚化,自身磷酸化,继而磷酸化并活化黏附斑激酶,通过积聚鸟核苷酸交换因子,促使与 Ras 结合的 GDP 脱落,以结合 GTP,激活 Ras,然后通过保守的三级酶促级联反应激活转录因子,调节特定的基因表达。已知 ERK5 和 ERK1/2 能启动即刻早期基因 c-Fos 和 c-Jun 的表达^[31],在 hMSCs 培养时添加成骨诱导剂,在 7 到 11 天便激活了 ERK 的活性,促进了 hMSCs 的分化。13 到 17 天时 JNK 被激活,同时细胞外基质合成、钙沉积增加。其他的一些非胶原蛋白,如层黏连蛋白-5、牙基质蛋白-3 可通过 ERK1/2 信号通路诱导 Cbfa-1 和 ALP 的表达,也能使 hMSCs 基质矿化增强、向成骨方向分化^[32]。总之,这些结果表明在 hMSCs 成骨分化过程中,MAPK 信号通路发挥了重要的作用。

4 Wnt、MAPK 信号对 TGF- β /BMP 信号转导途径的调节作用

在信号通路中,多水平调节能保证在适当的时间激活、抑制、终止信号以满足机体需要。在胚胎发育、组织形成、增殖、凋亡方面,TGF- β /BMP 发挥重要作用^[33]。在 BMP 配体刺激下,BMP 受体激酶磷酸化 Smads,例如 Smad1 (图 1)。这种 C 末端磷酸化促进了 Smads 与 Smad4 形成复合物,转移入核与 DNA 结合,最终激活 BMP 靶基因表达。最近的研究表明,核磷酸酶能消除 Smads C 末端受体磷酸化,抑制 Smads,使其从核穿出,以便进行再活化^[34]。Smads 就是通过这种磷酸化和脱磷酸化循环的方式

调控 BMP 受体活性的。

在 MAPK 通路中,ERK、JNK 和 p38 可通过磷酸化 Smads 控制其体内和体外的功能^[35,36]。MAPK 磷酸化 Smad1 MH1、MH2 连接区保守的丝氨酸/苏氨酸位点后,显著减少了 Smads 在核内的积聚,抑制 BMP 目的基因的表达(图 1)。因此,FGF 或 Ras 活化的 MAPK 信号通路,可以间接调节 BMP 通路的活性。研究表明,MAPK 样 Nemo 激酶(Nik)可以磷酸化果蝇的 Smad (Mad),促进其出核,抑制 BMP 通路活性^[37]。与 C 末端磷酸化促使 BMP 靶基因表达的观点不同,上述研究表明磷酸化也具有抑制 BMP 信号转导通路的作用。

Smurf1,即 Smad 泛素化调节因子(smud ubiquitination regulatory factors),是 E3 泛素连接酶家族的成员之一,能将靶蛋白泛素化、将蛋白酶体降解^[38],是调节 Smads 活性的另一个重要因子。Smurf1 以不依赖受体的方式降解 Smads。Sapkota 等^[39]发现,Smurf1 可与 MH1、MH2 连接区丝氨酸/苏氨酸磷酸化位点选择性结合,将蛋白泛素化降解。Smurf1 还可通过降解 Smads 或使其停滞在细胞质干扰 Smads 入核,最终减弱 BMP 信号。Smads 调节非常复杂,Smad1 的泛素化和降解不仅仅需要 MH1、MH2 连接处保守的丝氨酸/苏氨酸位点磷酸化,也需要连接区 GSK3 磷酸化^[40],从而下调 Smad1 的活性(图 1)。

GSK3 是具有多种功能的激酶,可通过 PI3 激酶、蛋白激酶 B 等,在 Wnt、Hedgehog 和胰岛素信号通路中发挥作用^[41]。Fuentelba 等^[40]证明,激活 Wnt 信号通路或者抑制 GSK3 可消除对 Smad1 的抑制作用。在 Wnt 通路中,Wnt 信号抑制 GSK3,使 β -连环蛋白稳定,同 Tcf/Lef 转录因子共同激活靶基因。但是,对于 GSK3 磷酸化的作用,仍存在一些差异。Fuentelba 等^[40]提出,GSK3 磷酸化是降解中关键性的步骤,能抑制 Smad1 的功能。而 Sapkota 等^[39]发现,GSK3 磷酸化并不是必需的,只有在 ERK 磷酸化 Smad1 之后,GSK-3 β 才将 Smad1 作为底物识别并磷酸化,进而促进 Smurf1 的结合和 Smad1 的泛素化,增加 Wnt 等通路调节 Smad1 的可能性(图 1)。

可见,在发育过程中,MAPK 和 GSK3 的负性调节同 BMP 和 Wnt 的正性作用相结合,交互对 Smad1 进行调节,从而对 TGF- β /BMPs 通路进行调控。在三者以及与 MSCs 成骨分化相关的其他通路共同作用下,使 MSCs 向成骨细胞分化,为骨组织工程等提供种子细胞。

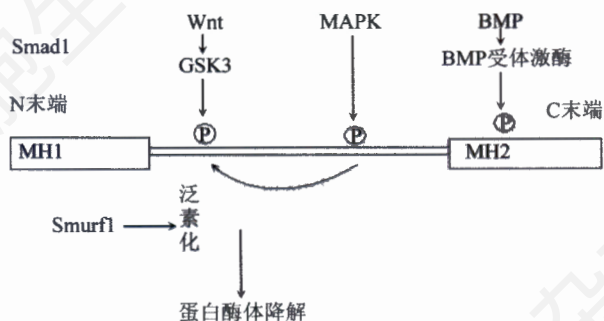


图 1 Wnt、MAPK 信号对 Smad1 的调节作用^[11,24,35,36,38-40]

参考文献 (References)

- [1] Pittenger MF *et al. Science*, 1999, **284**: 143
- [2] Yue J *et al. Pharmacol Ther*, 2001, **91**: 1
- [3] Nohe A *et al. Cell Signal*, 2004, **16**: 291
- [4] Sekelsky JJ *et al. Genetics*, 1995, **139**: 1347
- [5] Savage C *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 790
- [6] Massagué J *et al. EMBO J*, 2000, **19**: 1745
- [7] Ashique AM *et al. Int J Dev Biol*, 2002, **46**: 243
- [8] Kale S *et al. Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 954
- [9] Maeda S *et al. EMBO J*, 2004, **23**: 552
- [10] Muioli EK *et al. Tissue Eng*, 2006, **12**: 537
- [11] Ebisawa T *et al. J Cell Sci*, 1999, **112**: 3519
- [12] Urist MR. *Science*, 1965, **150**: 893
- [13] Reddi AH. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, **16**: 249
- [14] Xiao C *et al. Genes Dev*, 2003, **17**: 2933
- [15] Li JZ *et al. Gene Ther*, 2003, **10**: 1735
- [16] Cheng H *et al. J Bone Joint Surg Am*, 2003, **85-A**: 1544
- [17] Edgar AJ *et al. J Cell Biochem*, 2005, **94**: 202
- [18] Hong JH *et al. Science*, 2005, **309**: 1074
- [19] Diefenderfer DL *et al. Connect Tissue Res*, 2003, **44 Suppl 1**: 305
- [20] Friedman MS *et al. J Cell Biochem*, 2006, **98**: 538
- [21] Osyczka AM *et al. Endocrinology*, 2005, **146**: 3428
- [22] Miller JR. *Genome Biol*, 2002, **3**: REVIEWS3001
- [23] Westendorf JJ *et al. Gene*, 2004, **341**: 19
- [24] Monaghan H *et al. Histopathology*, 2001, **39**: 611
- [25] Rawadi G *et al. J Bone Miner Res*, 2003, **18**: 1842
- [26] Mbalaviele G *et al. J Cell Biochem*, 2005, **94**: 403
- [27] Raffetto JD *et al. Vasc Endovascular Surg*, 2006, **40**: 59
- [28] Tfelt-Hansen J *et al. Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, **285**: E329
- [29] Robinson MJ *et al. Curr Opin Cell Biol*, 1997, **9**: 180
- [30] Jaiswal RK *et al. J Biol Chem*, 2000, **275**: 9645
- [31] Kamakura S *et al. J Biol Chem*, 1999, **274**: 26563
- [32] Jadowiec J *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 53323
- [33] Waite KA *et al. Nat Rev Genet*, 2003, **4**: 763
- [34] Chen HB *et al. Genes Dev*, 2006, **20**: 648
- [35] Kretzschmar M *et al. Nature*, 1997, **389**: 618
- [36] Aubin J *et al. Genes Dev*, 2004, **18**: 1482
- [37] Zeng YA *et al. Development*, 2007, **134**: 2061
- [38] Zhu H *et al. Nature*, 1999, **400**: 687
- [39] Sapkota G *et al. Mol Cell*, 2007, **25**: 441
- [40] Fuentealba LC *et al. Cell*, 2007, **131**: 980
- [41] Forde JE *et al. Cell Mol Life Sci*, 2007, **64**: 1930

TGF- β /BMPs, Wnt and MAPK Signaling Pathways in Osteogenic Differentiation of the Mesenchymal Stem Cells

Xiao-Chen Wan, Cui-Ping Liu, Hai-Xiao Chen¹, Ji-Cheng Li*
 (Institute of Cell Biology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;
¹Zhejiang Provincial Taizhou Hospital, Linhai 317000, China)

Abstract Mesenchymal stem cells (MSCs) are a kind of multipotential adult stem cells which have the potential of differentiation into osteoblasts. The osteogenic differentiation of MSCs is regulated by several signaling pathways, among which, TGF- β /BMPs, Wnt and MAPK pathways may play significant roles. Furthermore, Wnt and MAPK pathways can modulate the TGF- β /BMPs signaling by the regulation of the proteasomal of Smad1. Recent studies indicate that differentiation of MSCs into osteoblasts is accurately regulated under many of the related signaling pathways. This review discuss recent advances in the TGF- β /BMPs, Wnt and MAPK signaling pathways involved in the differentiation of MSCs.

Key words mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; TGF- β /BMPs signaling pathway; Wnt signaling pathway; MAPK signaling pathway

Received: May 23, 2008 Accepted: September 1, 2008

This work was supported by the National Found for Fostering Talents of Basic Science (No.J0730856) and Science and Technology Department of Zhejiang Province (No.2007C33025)

*Corresponding author. Tel: 86-571-88208088, E-mail: lijichen@zju.edu.cn